第11卷 第4期 动物学研究 Vol. 11, No. 4
1990年11月 ZOOLOGICAL RESEARCH Nov., 1990

尖吻蝮(*Agkistrodon acutus*)蛇毒凝血酶样成分的研究
Ⅲ.蛇毒凝血酶止血效应的研究

何丽芬 肖昌华 董馥明* 杨连玺
（中国科学院昆明动物研究所）

摘 要

将纯化得到的蛇毒凝血酶（TLE_3、TLE_4），经家兔体内实验表明，2—3凝血酶单位/kg体重剂量能显著地使家兔全血凝血时间缩短1/3—1/2。药后1小时即有促凝作用，以2—4小时凝血（止血）效应最强，12小时已消失。与Hollemen, W. H. 等自美洲矛头蝮蛇毒中得到的蛇毒凝血酶（Hemocoagulase）相似。经家兔及家犬实验性创伤止血实验表明，对创伤出血有止血作用。

关键词：凝血酶样酶，蛇毒凝血酶，止血效应，止血药

Holleman, W. H.等（1976）从巴西产美洲矛头蝮（*Bothrope jararaca*）蛇毒中分离纯化得到了蛇毒凝血酶（Hemocoagulase, Reptilase, Batroxobin, Botropase），注射1单位经20分钟即可使健康人正常凝血时间缩短1/3—1/2。已成药用于临床，预防和治疗各种出血疾病。该酶已从蝰科、蝮亚科一些蛇毒中分离得到。台湾省Ouyang, C.，日本杉原久义等分别从尖吻蝮蛇毒中分离纯化得到了一个凝血酶样组分，Ouyang, C.得到的去纤维蛋白原酶，杉原久义得到的是促凝成分，但未见促凝血（止血）效应的报道。我们从尖吻蝮蛇毒中分离纯化得到4个凝血酶样同功酶，其中TLE_3、TLE_4与自巴西美洲矛头蝮蛇毒中得到的蛇毒凝血酶相似，结果报道于后。

材料和方法

1.蛇毒凝血酶按肖昌华等（1988）方法制备，将TLE_3、TLE_4按2：3混合，经G-6漏斗过滤，无菌灌封，每安瓿含30个凝血酶单位〔按凝血酶单位测定法测定，即在

* 云南省个旧生物制药厂。

本文1987年12月30日收到，1990年5月17修回。

37°C下能使0.1ml纤维蛋白原（4mg/ml）在15秒钟内凝结的酶量相当于1个凝血酶单位〕。放冰箱保存备用。

2.实验动物及化学试剂：家兔系日本大耳兔或云南本地产家兔，健康，体重2—3 kg。家犬购自昆明农村，健康，体重10—15kg。化学试剂系国产生化试剂或分析纯试剂。

3.止血棉的制备：将0.5kg消毒脱脂棉浸于浓度为15凝血酶单位/ml的尖吻蝮蛇毒凝血酶溶液200ml中，取出放无菌干燥器中真空干燥备用。

4.家兔体内促凝血效应的测定：取体重2—3 kg健康家兔25只，按雄3、雌2随机分为5组，每组5只。按每kg体重计，第1组1凝血酶单位；第2组2凝血酶单位；第3组3凝血酶单位，第4组4凝血酶单位；第5组为对照组。各组分别按动物体重、剂量取足蛇毒凝血酶量，用注射用生理盐水或葡萄糖注射液稀释到5 ml，耳静脉注射，对照组用5 ml生理盐水或葡萄糖注射液作对照。药前，药后0.5、1、2、3、4、5、7、12小时，由耳静脉取血，按Whit-Lee氏试管法（上海市医学化验所主编，1965）测定其全血凝血时间。

5.动物实验性创伤止血试验：参照止血药物的筛选方法（中国医学科学院药物研究所编，1972）进行。

（1）颈动脉损伤喷射性出血止血试验法：将6只体重2—3 kg健康的家兔，用30mg/kg剂量的戊巴比妥纳腹腔注射麻醉。将颈部皮肤切开创口3—5 cm，分离出颈动脉，然后用止血钳将动脉两端夹紧固定，切断血流，用手术剪将动脉管横向剪开造成创口宽度约达血管直径的1/3。放开止血钳，血液喷出，立即将蛇毒凝血酶药棉敷上并轻压使其紧贴，记录止血时间。3只作药物止血试验，另3只以脱脂棉同样操作作对照。

（2）中等动脉损伤喷射性出血止血试验法：将10—15kg体重家犬6只，用戊巴比妥纳30mg/kg剂量腹腔注射麻醉。将一后肢股动脉剔出，固定，横切血管约1/3直径的创口，放血喷出，立即用止血棉敷上并记录止血时间。3只作药物试验，3只以脱脂棉作对照。

（3）肝实质器官止血试验：同前将6只家兔麻醉，切开腹部使肝脏露出，将肝切一创口（长2 cm、宽1 cm、深0.5cm），血液喷出，立即将止血棉贴上，轻压，记录止血时间。3只作药物试验，3只以脱脂棉同样操作作对照试验。

（4）断离后肢止血试验法：待上述试验之家犬伤愈后，按前法进行麻醉，将犬的一后肢于膝关节以上用利斧垂直砍断，血液喷出，立即用止血棉敷上。适当加压，并用纱布包扎，记录止血时间。3只药物实验，3只以脱脂棉作对照。对实验家犬观察一月。

结　果

1.尖吻蝮蛇毒凝血酶家兔体内促凝血效应：结果表明，2或3凝血酶单位/kg剂量组，药后1—4小时，其全血凝血时间比药前缩短1/3—1/2，可见其促凝血（止血）效应是非常显著的；而1或4凝血酶单位/kg剂量组的促凝血效应则不显著。结果见表1。

2.家犬、家兔实验性创伤止血试验：结果见表2。

表 1　尖吻蝮蛇毒凝血酶对家兔全血凝血时间的影响

组别及给药剂量 / 全血凝血时间	1 1U/kg	2 2U/kg	3 3U/kg	4 4U/kg	5 生理盐水
药　前	5′01″	3′53″	3′22″	4′43″	3′25″
药后30′	4′46″	2′50″	3′11″	4′23″	3′12″
1hr	4′20″	2′35″	2′38″	4′17″	3′39″
2hr	3′45″	2′11″	1′58″	4′05″	3′22″
3hr	2′50″	1′27″	2′44″	4′49″	3′32″
4hr	3′01″	2′05″	2′48″	3′58″	3′49″
5hr	3′18″	2′22″	3′11″	4′03″	3′42″
7hr	3′35″	3′11″	3′18″	4′11″	3′31″
12hr	4′46″	4′18″	3′26″	4′31″	3′28″

注：每组家兔 5 只（3♂，2♀）；U = NIH unit

表 2　尖吻蝮蛇毒凝血酶止血棉对动物实验性创伤的止血效果

试验项目	兔颈动脉出血止血试验		兔肝实质器官止血试验		家犬股动脉损伤出血止血试验		家犬断离后肢止血试验	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
止血时间（分、秒）	2′17″	7′40″	2′05″	9′25″	3′02″	>10′	8′25″	>10′

注：每组 3 只家兔或家犬。对照组断肢家犬，由于失血太多，两只当日死亡，另一只 5 天死亡；实验组一只未死，一月仍健康活着。

由表 2 结果可见，尖吻蝮蛇毒凝血酶止血棉对动物实验性创伤有明显的止血作用，但对家犬断肢止血效果不太理想。

讨　论

1.经动物体内外凝血(止血)效应的研究表明，尖吻蝮蛇毒凝血酶（TLE_3　TLE_4）具有较强的止血作用，2—3 凝血酶单位/kg剂量即能使家兔全血凝血时间比正常时缩短1/2以上，与美洲矛头蝮蛇毒中分离得到的蛇毒凝血酶相似。因此，该酶制剂也可以作为有效止血药物应用。

2.经家兔不同剂量蛇毒凝血酶体内促凝血效应测定表明，给药剂量十分重要，偏高或偏低都会影响其凝血效应。经测定，家兔促凝血有效剂量为 2—3 凝血酶单位/kg。在有效剂量范围内，剂量大显效快，但消失也快，只有在最适剂量时，其止血效应才显著，而且维持时间较长。其原因有待进一步研究。

3.出血性疾病也是严重威胁人类健康的疾病，对它的出血机理及治疗作了大量的研究工作，也研制出不少的治疗药物，但还没有一个理想的药物。据生化药《药品集》第

七分册）介绍，自美洲矛头蝮蛇毒中提取的蛇毒凝血酶能预防和治疗各种出血，如手术前后毛细血管出血、咯血、胃出血、网膜出血、鼻出血、肾出血及拔牙出血等。该酶在体外是促凝的，在没有钙离子存在时也能使血液凝固，但在体内不会引起血栓，也不会诱发任何血管内凝血现象，是一个较好的止血药。尖吻蝮蛇毒凝血酶与上述蛇毒凝血酶相似，并可在制备“去纤酶”的同时得到，既填补了国内空白，又可降低“去纤酶”的成本。因此，应当开发为药用。

4. 尖吻蝮蛇毒凝血酶止血棉对动物实验性出血有明显的止血作用，但对家犬断肢止血不太理想。由于目前对外伤止血已有多种有效方法，在临床中已基本不用药物止血，因而对该酶的创伤止血研究仅作资料之用。

参考文献

上海市立医学化验所主编 1965 实用临床检验。p. 119。上海科学出版社。

中国医学科学院药物研究所编 1972 中草药有效成分的研究 第二分册 药物筛选法。170。人民卫生出版社。

肖昌华等 1988 尖吻蝮（*Agkistrodon acutus*）蛇毒凝血酶样成分的研究 Ⅰ. 分离、纯化及其理化特性的测定。动物学研究 9（增）：51—59。

肖昌华等 1989 尖吻蝮（*Agkistrodon acutus*）蛇毒凝血酶样成分的研究 Ⅱ. 酶学及血液活性的研究。动物学研究 10（3）：213。

Aragon Oritz, F. and F. Gubensek 1978 Some properties of asperase, a thrombin-like enzyme from *Bothrops asper* venom (Abstract). Proceedings on the third symp. on plant, Animal and Microbial Toxins, London, Sept. 13—15.

Egberg, N. 1973 Experimental and clinical studies on the thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops atrox*. On the primary structure of fragment E. Acta physiol. Suppl., 400.

Gubensek, F., V. Turk and B. Drujan 1978 Period Biol. 80(1):101.

Holleman, W. H. and Weiss L. 1976 J. Biol. Chem., 251:1663.

Nossel, H., J. Wasser, K. L. *et al*, 1979 Sequence of fibrinogen proteolysis and platelet release after intraterine infusion of hypertonic saline. J. Clin. Invest., 64, 1371—1378.

Ouyang, C., Hong, I. S. and C. H. Teng 1971 Purification and properties of the thrombin-like principle of *Agkistrodon acutus* and its comparison to bovine thrombin. Thromb. Diath. Haem., 26, 224—234.

Stocker, K. H. Fischer and J. Meier. 1982 Thrombin-like snake venom proteinases. Toxicon, 20(1): 265—273.

STUDIES ON THE THROMBIN-LIKE PRINCIPLES OF *Agkistrodon acutus* VENOM Ⅱ. STUDIES ON HEMOSTATIC EFFECT OF HEMOCOAGULASE

He Lifeng　Xiao Changhua　Dong Fuming　Yang Lianxi

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

Thrombin-like enzymes (TLE_3, TLE_4) had been isolated and purified from the venom of *Agkistrodon acutus*. With 2—3 NIH units/kg in vivo the result showed that the blood coagulation time of rabbits was shortened in 1/3—1/2. In vivo eyperiments (2NIH or 3NIH/kg) after 1 hr TLE began to show effect, after 2—4 hr the effect was most strong, after 12 hr there was no effect. The properties of TLE is similar to hemocoagulase from venom *Bathrope jararaca*. The experiments showed that TLE 3 and 4 of *A. acutus* can used as hemostatic agents.

Key words: Thrombin-like enzyones (TLE), Hemocoagulase, Hemostasis, Hemostatic drug